

桑黄总黄酮超声提取工艺及其生物活性研究

回晶¹, 李其久¹, 边媛媛¹, 尤田², 庞冲¹, 吴娜¹, 胡风庆¹

(1. 辽宁大学生命科学院, 辽宁 沈阳 110036; 2. 辽宁省中医药研究院, 辽宁 沈阳 110034)

摘要: 目的: 优化提取桑黄总黄酮的最佳工艺条件, 测定其体外抗氧化活性和对癌细胞的生长抑制作用。方法: 以样品中总黄酮的提取率为指标, 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验对桑黄的超声辅助提取工艺参数进行优化; 通过测定桑黄黄酮对 $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{O}_2\cdot^-$ 的清除能力等指标, 探讨其抗氧化活性; 采用 MTT 法测定桑黄黄酮对大肠癌细胞 CX-1 增殖反应的影响, 研究其体外抗肿瘤活性。结果: 桑黄总黄酮的最佳提取工艺为乙醇体积分数 55%、料液比 1:20(g/mL)、提取温度 70℃、超声提取时间 1.5h。桑黄黄酮可以有效清除 $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{O}_2\cdot^-$, 对 Fe^{2+} 诱发卵黄低密度脂蛋白(LDL)多不饱和脂肪酸(PUFA)过氧化反应具有抑制作用。桑黄黄酮提取物能够有效地抑制大肠癌细胞 CX-1 的生长。结论: 该工艺提取桑黄总黄酮, 方法简单、耗时短。桑黄黄酮抗氧化能力强, 有抑制癌细胞的作用, 是一种有效的天然抗氧化剂。

关键词: 桑黄; 总黄酮; 正交试验; 抗氧化; 生长抑制

Ultrasound-assisted Extraction and Biological Activity of Total Flavonoids from *Phellinus igniarius*

HUI Jing¹, LI Qi-jiu¹, BIAN Yuan-yuan¹, YOU Tian², PANG Chong¹, WU Na¹, HU Feng-qing¹

(1. Faculty of Life Sciences, Liaoning University, Shenyang 110036, China;

2. Liaoning Province Academic of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110034, China)

Abstract: Objective: To optimize the extraction conditions of total flavonoids from *Phellinus igniarius* and determine its antioxidant activity and inhibition effect on the growth cancer cells. Methods: The ultrasound-assisted extraction processing parameters for total flavonoids from *Phellinus igniarius* were optimized by orthogonal experiments through evaluating the extraction rate of total flavonoids. The antioxidant activity of total flavonoids was explored by evaluating the scavenging capability on hydroxyl and superoxide anion free radicals. The anti-tumor activity of total flavonoids was evaluated by MTT assays through determining the inhibition effect on the proliferation of human colorectal cancer CX-1 cells *in vitro*. Results: The optimal extraction processing parameters were ethanol concentration of 55%, extraction temperature of 70℃, material-liquid ratio of 1:20 (g/mL) and extraction time of 1.5 h. The total flavonoids from *Phellinus igniarius* exhibited strong scavenging capability on hydroxyl and superoxide anion free radicals. Meanwhile, the total flavonoids could effectively inhibit the peroxidation of polyunsaturated fatty acids. Moreover, the total flavonoids had strong inhibitory effect on the growth of human colorectal cancer CX-1 cells. Conclusion: This extraction processing for total flavonoids is sample and convenient. The total flavonoids from *Phellinus igniarius* have strong antioxidant activity and strong inhibitory effect on the growth of cancer cells. Therefore, The total flavonoids from *Phellinus igniarius* have a promising potential as the effective natural antioxidant and anticancer components.

Key words: *Phellinus igniarius*; total flavonoids; orthogonal experiment; antioxidation; growth inhibition

中图分类号: O623.54

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2010)24-0195-04

桑黄(*Phellinus igniarius*)是担子菌亚门(Basidiomycota)、层菌纲(Hymenomycetes)、非褶菌目(Aphyllorphorales)、锈革孔菌科(Hymenochaetaceae)、针层孔菌属(*Phellinus*)的药用真菌^[1]。现代研究表明桑黄具有抗肿瘤, 增强免疫力、抗发炎、抗氧化、预防和治疗关

节炎、保护肝脏、抗糖尿病、抗胃溃疡等多种药理活性^[2-5]。其特有的抗肿瘤活性及低毒性使其成为研究热点^[6-7], 因此该菌是一种极具研究和开发价值的食药两用真菌。本研究对桑黄黄酮的提取工艺及生物活性进行研究, 以期为进一步开发利用桑黄提供一定参考。

收稿日期: 2010-09-26

基金项目: 辽宁省教育厅科学基金项目(L2010150); 沈阳发改委高技术研发基金项目(2010-16);

辽宁大学青年科研基金项目(2008LDQN25)

作者简介: 回晶(1977—), 女, 讲师, 博士, 研究方向为功能性食品。E-mail: huijing@lnu.edu.cn

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

桑黄子实体购于东北食药真菌研究所, 由本院微生物系郭叔凡副教授鉴定, 粉碎过筛备用。芦丁标准品(纯度 99%, 批号 TCM027-080118) 南京替斯艾中中药研究所; 大肠癌细胞系 CX-1 中国医科大学; DMEM 高糖培养基 HyClone 公司; 四甲基偶氮唑盐(MTT) BBI 公司; 其余化学试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

BS223S 型电子天平 德国赛多利斯公司; KQ2200DB 型数控超声波清洗器; RE52CS-2 旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂; BB15 CO₂ 培养箱 Heraeus 公司; Multiskan MK3 酶标仪 Thermo Labsystems 公司; 分光光度计。

1.3 方法

1.3.1 标准曲线绘制^[8]

精密称取芦丁标准品 20mg, 置 50mL 容量瓶中, 加 70% 乙醇稀释至刻度, 摇匀, 即得 0.4mg/mL 芦丁标准液备用。准确吸取标准芦丁溶液 0.0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7mL, 置于试管中。加 70% 乙醇至 5mL, 再加入 5mL 显色液(硼酸 0.4g、乙酸钠 0.5g、用 70% 乙醇稀释至 50mL), 混匀, 加相应试剂做空白, 处理后置比色杯中, 在波长 385nm 处测定其吸光度, 以芦丁质量浓度为横坐标, 吸光度为纵坐标绘制标准曲线, 得回归方程 $y=19.796x+0.0153$, $R^2=0.9967$ 。

1.3.2 超声提取总黄酮工艺优化

根据黄酮提取工艺的文献报道^[9-11], 选择影响桑黄总黄酮提取的 4 个因素, 即料液比、提取温度、提取时间和乙醇体积分数, 每个因素取 3 个水平, 超声频率固定为 90Hz, 以提取率作为评价指标对超声提取工艺进行正交试验优化(表 1)。

表 1 超声提取总黄酮正交试验因素水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal experiments for optimizing the extraction processing of total flavonoids from *Phellinus igniarius*

| 水平 | A 料液比(g/mL) | B 提取温度/℃ | C 提取时间/h | D 乙醇体积分数/% |
|----|-------------|----------|----------|------------|
| 1 | 1:10 | 50 | 0.5 | 55 |
| 2 | 1:15 | 60 | 1.0 | 75 |
| 3 | 1:20 | 70 | 1.5 | 95 |

1.3.3 总黄酮的鉴别

盐酸-镁粉反应: 取桑黄总黄酮提取液 1mL 于试管中, 加入少量镁粉振摇, 再滴入几滴浓盐酸, 1min 后溶液均显紫红色。

三氯化铝显色反应: 取桑黄总黄酮提取液适量和 1% 三氯化铝乙醇溶液通过纸斑反应后, 置于紫外灯下, 均显鲜黄色荧光。

1.3.4 桑黄总黄酮含量的测定及提取率

取正交试验各桑黄提取液, 抽滤, 定容到 100mL。精密吸取上述溶液 0.2mL, 按照 1.3.1 节方法测其吸光

度, 按照回归方程计算提取液中的总黄酮含量。

$$\text{总黄酮提取率}/\% = \frac{\text{提取液总黄酮含量}}{\text{桑黄样品质量}} \times 100$$

1.3.5 桑黄总黄酮的体外抗氧化活性研究

按正交试验最优提取工艺提取桑黄总黄酮, 进行体外抗氧化实验和肿瘤细胞增殖抑制实验。

1.3.5.1 对羟自由基清除率的测定^[12]

利用 H₂O₂ 对 Fe²⁺ 混合产生 ·OH, 在体系内加入水杨酸捕捉 ·OH 并产生有色物质, 该物质在波长 510nm 处有最大吸收。反应体系中含有 2mL 9mmol/L FeSO₄、2mL 9mmol/L 水杨酸-乙醇、不同浓度的桑黄黄酮溶液 2mL, 最后加 2mL 8.8mmol/L H₂O₂ 启动反应, 37℃ 反应 0.5h, 以蒸馏水为参比, 在波长 510nm 处测量各浓度的吸光度。考虑到本身的吸光度, 以 2mL 9mmol/L FeSO₄、2mL 9mmol/L 水杨酸-乙醇、不同浓度的桑黄黄酮溶液 2mL 为黄酮的本底吸收。

$$\cdot\text{OH 清除率}/\% = \frac{A_0 - (A_i - A_{0i})}{A_0} \times 100$$

式中: A₀ 为对照(以蒸馏水代替黄酮样品)的吸光度; A_i 为加不同浓度黄酮样品时的吸光度; A_{0i} 为无 H₂O₂ 时黄酮样品的吸光度。

1.3.5.2 对超氧阴离子自由基清除率的测定^[12]

采用邻苯三酚自氧化法, 取 4.5mL pH8.2 50mmol/L Tris-HCl 缓冲溶液, 混匀后在 25℃ 水浴中保温 20min, 先加入不同浓度的黄酮溶液, 用蒸馏水补足到 8.7mL, 取出后立即加入在 25℃ 预热过的 0.3mL 3mmol/L 邻苯三酚(以 10mmol/L HCl 配制, 空白管用 10mmol/L HCl 代替邻苯三酚的 HCl 溶液), 迅速摇匀后倒入比色杯, 325nm 波长处每隔 30s 测定吸光度, 计算线性范围内每分钟吸光度的增加。然后按下述方法计算清除率。

$$\text{超氧阴离子自由基清除率}/\% = \frac{\Delta A_0 - \Delta A}{\Delta A_0} \times 100$$

式中: ΔA₀ 为邻苯三酚的自氧化法速率差; ΔA 为加入黄酮溶液后邻苯三酚自氧化法速率差。

1.3.5.3 对 Fe²⁺ 诱发卵黄低密度脂蛋白(LDL)多不饱和脂肪酸(PUFA)过氧化反应的抑制作用^[13]

取 7 支具塞刻度试管, 分别加入 0.2mL 1:25 稀释的卵黄悬浊液(卵黄用等体积 pH7.4 的磷酸缓冲液配成, 用前进行磁力搅拌 10min), 再分别加入 1mL 不同浓度的桑黄黄酮样液、0.2mL 25mmol/L FeSO₄·7H₂O 溶液, 用磷酸缓冲液补足 2mL, 置 37℃ 恒温水浴中振荡 30min, 取出后加入 0.5mL 质量分数 20% 三氯乙酸溶液和 1mL 质量分数 0.85% 硫代巴比妥酸(TBA), 混匀, 置 100℃ 水

浴保温 20min, 冷却后于 3500r/min 离心 15min, 取 3mL 上清液测定 532nm 处的吸光度。用 VC 标准液作对照。

$$\text{抑制率} / \% = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100$$

式中: A_0 为对照品(以蒸馏水代替黄酮样品)的吸光度; A 为加不同浓度黄酮样品时的吸光度。

1.3.6 桑黄总黄酮对大肠癌细胞生长的抑制作用

将 CX-1 肿瘤细胞以 2×10^5 个/mL 接种于 96 孔板中, 每孔 100 μ L。实验组分别加入 100 μ L 质量浓度 10、5、2.5、1.25、0.625 μ g/mL 桑黄黄酮溶液, 以 5 μ g/mL 5-氟尿嘧啶(5-Fu)作为阳性对照, 以质量浓度 5 μ g/mL BSA 作为阴性对照, 空白对照组用培养基代替受试药物, 每组设 6 个平行孔, 于 5% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱中培养 24h, 换液, 继续培养 48h 后, 弃上清液, 每孔加入 50 μ L 5mg/mL MTT 溶液, 于 5% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱中继续培养 4h, 终止培养后离心 96 孔板, 去上清液, 每孔加 150 μ L DMSO 溶解 10min, 酶联免疫检测仪振荡, 于波长 570nm 测定 OD 值。并计算细胞抑制率。

$$\text{细胞抑制率} / \% = \frac{\text{OD}_{\text{空白}} - \text{OD}_{\text{实验}}}{\text{OD}_{\text{空白}}} \times 100$$

2 结果与分析

2.1 桑黄总黄酮提取工艺优化

表 2 正交试验设计及结果

Table 2 Design and results of orthogonal experiments for optimizing the extraction processing of total flavonoids from *Phellinus igniarius*

| 试验号 | A | B | C | D | 总黄酮提取率/% |
|-------|-------|-------|-------|-------|----------|
| 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0.391 |
| 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 0.564 |
| 3 | 1 | 3 | 3 | 3 | 0.387 |
| 4 | 2 | 1 | 2 | 3 | 0.274 |
| 5 | 2 | 2 | 3 | 1 | 1.145 |
| 6 | 2 | 3 | 1 | 2 | 1.053 |
| 7 | 3 | 1 | 3 | 2 | 0.849 |
| 8 | 3 | 2 | 1 | 3 | 0.394 |
| 9 | 3 | 3 | 2 | 1 | 1.277 |
| K_1 | 1.342 | 1.514 | 1.838 | 2.813 | T=6.334 |
| K_2 | 2.472 | 2.103 | 2.115 | 2.466 | |
| K_3 | 2.520 | 2.717 | 2.381 | 1.055 | |
| k_1 | 0.447 | 0.505 | 0.613 | 0.938 | |
| k_2 | 0.824 | 0.701 | 0.705 | 0.822 | |
| k_3 | 0.840 | 0.906 | 0.794 | 0.352 | |
| R | 0.393 | 0.401 | 0.181 | 0.586 | |

由表 2 极差值可以看出, 各因素对桑黄总黄酮的提取影响程度为 $D > B > A > C$, 即乙醇提取溶剂的体积分数是影响桑黄总黄酮提取的主要因素, 其次是温度, 再次是料液比, 对黄酮提取含量影响最小的是提取时间。

结果表明, 桑黄总黄酮提取的最佳条件组合为

$A_3B_3C_3D_1$, 即料液比 1:20(g/mL)、提取温度 70 $^{\circ}\text{C}$ 、提取时间 1.5h、乙醇体积分数 55%。

2.2 验证实验

最优的提取工艺为 $A_3B_3C_3D_1$, 并未在正交试验中进行, 需进行验证实验。按 1.3.4 节方法测得总黄酮提取率为 1.614%, 结果与正交试验结论一致。

2.3 桑黄总黄酮的体外抗氧化研究

2.3.1 桑黄总黄酮清除羟自由基能力测定

表 3 桑黄总黄酮清除羟自由基能力测定 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Scavenging capability of total flavonoids from *Phellinus igniarius* on hydroxyl free radicals ($\bar{x} \pm s, n=3$)

| 样品质量浓度/(mg/mL) | $A_{510\text{nm}}$ | | 清除率/% |
|----------------|--------------------|-------------------|-------|
| | 样品组 | 本底组 | |
| 0.00(CK) | 0.162 \pm 0.005 | | — |
| 0.08 | 0.162 \pm 0.009 | 0.056 \pm 0.002 | 34.57 |
| 0.16 | 0.202 \pm 0.006 | 0.112 \pm 0.006 | 44.44 |
| 0.32 | 0.235 \pm 0.005 | 0.155 \pm 0.005 | 50.62 |
| 0.64 | 0.329 \pm 0.001 | 0.260 \pm 0.006 | 57.41 |
| VC(0.08) | 0.165 \pm 0.002 | 0.025 \pm 0.003 | 13.58 |

采用水杨酸法, 固定反应时间测定桑黄黄酮样品对 $\cdot\text{OH}$ 的清除作用。结果见表 3, 在实验测定的质量浓度范围内, 桑黄黄酮对羟自由基的清除能力随黄酮质量浓度的增大而增大。在质量浓度 0.64mg/mL 时, 对羟自由基的清除率达到 57.41% 以上, 清除效果较好。

2.3.2 桑黄总黄酮清除超氧阴离子自由基能力的测定

表 4 桑黄总黄酮清除超氧阴离子自由基能力的测定 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Scavenging capability of total flavonoids from *Phellinus igniarius* on superoxide anion free radicals ($\bar{x} \pm s, n=3$)

| 样品质量浓度/(mg/mL) | 速率($\Delta A_{525\text{nm}}$) | 清除率/% |
|----------------|---------------------------------|-------|
| 自氧化 | 0.049 \pm 0.006 | — |
| 0.08 | 0.037 \pm 0.005 | 24.5 |
| 0.16 | 0.026 \pm 0.004* | 46.9 |
| 0.32 | 0.023 \pm 0.001* | 53.1 |
| 0.64 | 0.016 \pm 0.002* | 67.3 |

注: *. $P < 0.05$, 与对照组相比差异显著。

从表 4 可以看出, 在实验测定的质量浓度范围内, 桑黄黄酮对超氧阴离子自由基的清除能力随质量浓度的增加呈增大的趋势, 在质量浓度 0.64mg/mL 时, 对超氧阴离子自由基的清除能力已达到 67.3% 以上。除 0.08mg/mL 样品组与对照组相比无差异外, 其他组与对照组相比差异显著。桑黄黄酮提取物具有很好的清除超氧阴离子自由基能力。

2.3.3 对 Fe^{2+} 诱发卵黄低密度脂蛋白多不饱和脂肪酸(PUFA)过氧化反应的抑制作用

由表 5 可以看出, 桑黄黄酮提取物和 VC 对 Fe^{2+} 诱发卵黄低密度脂蛋白多不饱和脂肪酸(PUFA)过氧化具有

明显的抑制作用,抑制作用随样品质量浓度的升高而增强。其中桑黄黄酮提取物 0.04、0.08mg/mL 组与空白组相比差异显著,0.016、0.32、0.64mg/mL 组与空白组相比差异极显著。但同浓度条件下桑黄黄酮提取物实验组与 VC 相比无显著性差异。

表 5 桑黄总黄酮提取物对 PUFA 过氧化反应的抑制结果($\bar{x} \pm s$, $n=3$)
Table 5 Inhibitory effect of total flavonoids from *Phellinus igniarius* on peroxidation reaction of PUFA in yolk induced by Fe^{2+} ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

| 样品质量浓度/(mg/mL) | A_{532nm} | 抑制率/% |
|----------------|------------------------|-------|
| 0(CK) | 1.437 ± 0.109 | — |
| 0.04 | $0.944 \pm 0.008^*$ | 34.3 |
| 0.08 | $0.858 \pm 0.030^*$ | 40.3 |
| 0.16 | $0.798 \pm 0.008^*$ | 44.5 |
| 0.32 | $0.548 \pm 0.024^{**}$ | 61.9 |
| 0.64 | $0.449 \pm 0.007^{**}$ | 68.8 |
| VC(0.04) | $1.012 \pm 0.083^*$ | 29.6 |
| VC(0.08) | $0.865 \pm 0.024^*$ | 39.8 |

注: $^*P < 0.05$, 与对照组相比差异显著; $^{**}P < 0.01$, 与对照组相比差异极显著。

2.4 桑黄总黄酮对大肠癌细胞 CX-1 的增殖抑制作用

表 6 桑黄总黄酮对大肠癌 CX-1 的增殖抑制作用($\bar{x} \pm s$, $n=4$)
Table 6 Inhibitory effect of total flavonoids from *Phellinus igniarius* on the growth of human colorectal cancer CX-1 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

| 样品 | 质量浓度/(μ g/mL) | OD_{570nm} | 抑制率/% |
|--------|--------------------|---------------------|--------|
| 5-Fu | 5 | 0.047 ± 0.026 | 90.25* |
| 1 | 10 | $0.159 \pm 0.086^*$ | 75.30* |
| 2 | 5 | $0.187 \pm 0.043^*$ | 71.56* |
| 黄酮样品 3 | 2.5 | 0.366 ± 0.116 | 47.66 |
| 4 | 1.25 | 0.309 ± 0.132 | 55.27 |
| 5 | 0.625 | 0.467 ± 0.136 | 34.18 |
| DMSO | 0.05% | 0.492 ± 0.022 | 30.84 |
| BSA | 5 | 0.690 ± 0.345 | 4.41 |
| DMEM | 0 | 0.723 ± 0.299 | — |

注: $^*P < 0.05$, 与对照组相比差异显著。

由表 6 可知,空白对照组细胞体外生长良好,5 种质量浓度的桑黄黄酮溶液对大肠癌细胞都表现出抑制作用,随着桑黄黄酮提取物质量浓度的升高,其抑制细胞生长的能力越强,剂量效应关系明显。通过方差分析可知,样品 1、样品 2 与空白对照组相比,差异显著;DMSO、BSA 与空白对照组相比,无差异;样品 3 与样品 4 相比较,无差异。

3 结 论

超声波辅助提取桑黄黄酮方法简单,时间短,最佳提取工艺条件:料液比 1:20(g/mL),提取温度 70℃、提取时间 1.5h、乙醇体积分数 55%。

桑黄黄酮对碱性邻苯三酚自氧化产生的超氧阴离子自由基、Fenton 反应产生的羟自由基和 Fe^{2+} 诱发卵黄低密度脂蛋白(LDL)多不饱和脂肪酸(PUFA)过氧化产生的烷

氧基($LO \cdot$)和烷过氧基($LOO \cdot$)均有明显的抑制作用,且均呈现一定的量效关系。其清除自由基的原理是该化合物具有酚羟基,能与自由基反应,形成共振稳定的半醌式自由基而中断链式反应。共振半醌式自由基的稳定性越大,黄酮类化合物的抗氧化活性越强。桑黄总黄酮抗脂质过氧化的机理可能与 Gulcin 等^[14]的报道相一致。其抗脂质过氧化机理主要分为两部分,其一是通过供氢与氧化过程中产生的氧自由基(ROS)结合,终止脂质过氧化的链式反应,达到抑制氧化的作用。其二是与 Fe^{2+} 螯合。金属离子 Fe^{2+} 、 Cu^{2+} 等是脂质过氧化的重要促进剂,其主要作用是促进过氧化脂(ROOH)和脂分子(RH)的分解和氧分子活化产生自由基,从而可以进入脂质氧化链式反应,促进反应发生。

桑黄黄酮提取物对人大肠癌细胞 CX-1 有明显的生长抑制作用,且呈一定量效关系。

通过生物体外实验表明,桑黄总黄酮具有体外抗氧化活性及癌细胞生长抑制作用,为其在生物体内实验奠定了实验基础,为其作为抗氧化药物、保健品提供了参考。下一步的研究工作将对提取物中的黄酮作进一步的分离、纯化和鉴定,探讨各黄酮组分在抗氧化活性和对癌细胞生长抑制中所起的作用及其机制,为进一步揭示桑黄黄酮提取物抗氧化活性和抗癌机理提供理论依据。

参考文献:

- [1] 张小青,戴玉成.中国真菌志[M].北京:科学出版社,2005:117-191.
- [2] SASAKI T, FUJII K, SUGURA M, et al. Antitumor polysaccharides from some polyporaceae, *Ganoderma. Applanatum* (Pers.) Pat and *Phellinus linteus* (Berk.&Curt) Teng[J]. Chem Pharm Bull, 1971, 19: 821.
- [3] AJITH T A, JANARDHANAN K K. Cytotoxic and antitumor activities of a polypore macrofungus, *Phellinus rimosus* (Berk) Pilat[J]. Ethnopharmacol, 2003, 84(2): 157-162.
- [4] 张万国,胡晋红,蔡漆,等.桑黄抗大鼠肝纤维化作用实验研究[J]. 中医学杂志,2001,19(5): 518-519.
- [5] SHON M Y, KIM T H, SUNG N J. Antioxidants and free radical scavenging activity of *Phellinus baumii* (*Phellinus* of Hymenochaetaceae) extracts[J]. Food Chemistry, 2003, 82: 593-597.
- [6] RAYNAUD C M, SABATIER L, PHILIPOT O, et al. Telomere length, telomeric proteins and genomic instability during the multistep carcinogenic process[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2008, 66(2): 99-117.
- [7] CAIRNEY C J, KEITH W N. Telomerase redefined: integrated regulation of hTR and hTERT for telomere maintenance and telomerase activity[J]. Biochimie, 2008, 90(1): 13-23.
- [8] 刘艳芳,杨焱,贾薇,等.药用真菌桑黄总黄酮测定方法研究[J]. 食用菌学报,2006,13(2): 45-48.
- [9] 舒馨,刘雄民,王巧.八角和八角残渣总黄酮提取工艺优化[J]. 食品科学,2010,31(6): 65-69.
- [10] 刘亚敏,刘玉民,马明,等.枫香树叶总黄酮提取工艺优化及含量动态变化[J]. 食品科学,2010,31(4): 35-38.
- [11] 夏国华,戈延茹,傅海珍,等.超声法提取桑黄总黄酮的工艺研究[J]. 江苏大学学报:医学版,2010,20(1): 40-41.
- [12] 莫开菊,柳圣,程超.生姜黄酮的抗氧化活性研究[J]. 食品科学,2006,27(9): 110-115.
- [13] 张海生,陈锦屏.蜂蛹黄酮的提取及体外抗氧化作用的研究[J]. 食品科学,2008,29(2): 158-162.
- [14] GULCIN I, BEYDEMIR S, ALICI H A, et al. *In vitro* antioxidant properties of morphine[J]. Pharmacological Research, 2004, 49: 59-66.